

## Method for purifying sodium hyaluronate

Patent number: CN1195027  
Publication date: 1998-10-07  
Inventor: SUGA SHIGENORI (JP); MUROI HENICHI (JP);  
KINOSHITA TADASHI (JP)  
Applicant: KYOWA HAKKO KOGYO KK (JP)  
Classification:  
- international: **C08B37/08; C12P19/26; C08B37/00; C12P19/00;**  
(IPC1-7) C12P19/04; C08B37/08; C12P19/26  
- european: G08B37/00P2F; C12P19/26  
Application number: CN19980105885 19980325  
Priority number(s): JP19970074859 19970327

Also published as:

 EP0867453 (A2)  
 EP0867453 (A3)

[Report a data error here](#)

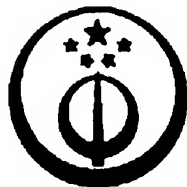
Abstract not available for CN1195027

Abstract of corresponding document: **EP0867453**

Highly purified sodium hyaluronate having a low content of pyrogen is obtained by adding a salt and a water-soluble organic solvent to a solution containing sodium hyaluronate, or to a sodium hyaluronate solution previously filtered through a positively charged filter, precipitating and sedimenting the sodium hyaluronate and taking out a supernatant to remove pyrogen.

Data supplied from the [esp@cenet](mailto:esp@cenet) database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 98105885.X

[43]公开日 1998 年 10 月 7 日

[11] 公开号 CN 1195027A

[22]申请日 98.3.25

[30]优先权

[32]97.3.27 [33]JP[31]74859/97

[71]申请人 协和发酵工业株式会社

地址 日本东京

[72]发明人 菅繁纪 室井健一

木下格 后藤让治

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标  
事务所

代理人 杨宏军

权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 透明质酸钠的纯化方法

[57]摘要

本发明提供了能够容易地获得热源物质含量低且纯度高的透明质酸钠的纯化方法, 以及由该纯化方法获得的透明质酸钠。本发明的纯化方法的特征在于在含有透明质酸钠的溶液中或是在含有透明质酸钠的溶液通过带正电的过滤器后的滤液中, 加入盐和水溶性有机溶剂, 使透明质酸钠析出沉降, 通过抽出上清液从而除去热源物质。

1.透明质酸钠的纯化方法，其特征在于，在含有透明质酸钠的透明质酸钠溶液中加入盐和水溶性有机溶剂，使透明质酸钠析出、沉降，通过抽出上清液从而除去热源物质。

2.权利要求 1 记载的纯化方法，其中在透明质酸钠溶液中含有 0.001 - 1 % ( w/v ) 的透明质酸钠。

3.权利要求 1 记载的纯化方法，其中的透明质酸钠是来自鸡冠或微生物的透明质酸钠。

4.权利要求 3 记载的纯化方法，其中的微生物是属于链球菌 (Streptococcus) 属的微生物。

5.权利要求 4 记载的纯化方法，其中属于链球菌 ( Streptococcus ) 属的微生物是兽瘟链球菌 ( Streptococcus zooepidemicus ) NCTC7023 。

6.权利要求 1 记载的纯化方法，其中盐的添加量是 1 - 30 % ( w/v ) 。

7.权利要求 1 或 6 记载的纯化方法，其中的盐是钠盐。

8.权利要求 7 记载的纯化方法，其中的钠盐选自氯化钠、硫酸钠和醋酸钠。

9.权利要求 1 记载的纯化方法，其中水溶性有机溶剂的添加量是 30 - 45 % ( v/v ) 。

10.权利要求 1 记载的纯化方法，其中的水溶性有机溶剂是甲醇、乙醇或丙酮。

11.权利要求 1 或 2 记载的纯化方法，其中含有透明质酸钠的透明质酸钠溶液是经过处理的透明质酸钠溶液，所说的处理是使透明质酸钠溶液通过在 pH3 - 10 的溶液中带正电的微孔过滤器。

12.权利要求 11 记载的纯化方法，其中带正电的微孔过滤器的孔径为 0.20-5.0  $\mu$  m 。

13.权利要求 11 记载的纯化方法，其中透明质酸钠溶液含有盐。

14.权利要求 13 记载的纯化方法，其中盐的添加量是 0.1 - 30 % ( w/v ) 。

15.权利要求 13 或 14 记载的纯化方法，其中的盐是钠盐。

16.权利要求 15 记载的纯化方法，其中的钠盐选自氯化钠、硫酸钠和醋酸钠。

17.透明质酸钠的纯化方法，其特征在于，在由上述权利要求 1 - 16 中任一项记载的纯化方法获得的透明质酸钠中加入 50 - 100 % ( v/v ) 的水溶性有机溶剂，洗涤透明质酸钠后真空干燥。

18.由权利要求 1 - 17 中任一项记载的纯化方法得到的透明质酸钠。

19.热源物质含量低于 0.003EU/mg 的透明质酸钠。

## 透明质酸钠的纯化方法

本发明涉及透明质酸钠的纯化方法和由该纯化方法获得的透明质酸钠。

目前已知的有不含链球菌溶血素的无溶血性的透明质酸钠（特公平 3 - 78116）；对于人多形核白细胞的趋化性低且在家兔的眼内给与时对细胞的侵害性低的透明质酸钠（特公平 6 - 8323）；不含热源物质的高纯度透明质酸钠（特开昭 62 - 501471）等。

透明质酸钠的工业制法已知有纯化鸡冠提取物的方法，以及纯化由链球菌属的菌株得到的发酵液而获得透明质酸钠的方法。

作为除去透明质酸钠中作为杂质存在的热源物质等高分子量化合物的方法，已知有以下几种方法：用三氯乙酸、氯仿 - 异戊醇处理；酶处理的方法（特开昭 60 - 24194）；离子交换树脂处理法（特开昭 63 - 12293）；吸附树脂处理法（特开平 2 - 103203）；十六烷基氯化吡啶鎓（特开昭 60 - 133894）；用大量的水溶性有机溶剂等有选择地使透明质酸钠沉淀的方法（特开平 2 - 268765）；将 2 - 6 万厘沱粘度的溶液在 pH6 - 10 的溶液中通过带正电的过滤器从而除去热源物质的方法（特开平 6 - 199656）等。

上述这些方法虽然能够提供无溶血性、无化学趋化性、热源试验呈阴性的透明质酸钠，但为除去热源物质必须要进行繁杂的操作。

因此目前希望开发一种能够容易地从透明质酸钠除去热源物质的纯化方法。

本发明的目的在于提供一种容易地获得热源物质含量低的高纯度透明质酸钠的纯化方法以及由该纯化方法获得的透明质酸钠。

本发明提供一种透明质酸钠的纯化方法及由该纯化方法获得的透明质酸钠，其特征在于，在含有透明质酸钠的透明质酸钠溶液中加入盐和水溶性有机溶剂，使透明质酸钠析出·沉降，抽出上清液，从而除去热

源物质。

另外，本发明还提供另一种透明质酸钠的纯化方法和由该纯化方法获得的透明质酸钠，其特征在于将含有透明质酸钠的透明质酸钠溶液通过带正电的过滤器，再用与上述相同的方法除去热源物质。

另外，本发明还提供另外一种透明质酸钠的纯化方法和由该方法获得的透明质酸钠，其特征在于将由上述方法获得的透明质酸钠用 50 % ( v/v ) 以上的水溶性有机溶剂洗涤，成为粉末状后再进行真空干燥，由此进一步降低热源物质。

本发明中使用的透明质酸钠可以来自微生物、动物等，与透明质酸钠的分子量无关。

透明质酸钠例如可以举出由玻璃体、脐带、关节液、鸡冠等分离得到的物质，以及由酿脓链球菌 ( *Streptococcus pyogenes* )、马链球菌 ( *Streptococcus equi* )、*Streptococcus equismilis*、停乳链球菌 ( *Streptococcus dysgalactiae* )、兽痘链球菌 ( *Streptococcus zooepidemicus* ) 等微生物生产的物质。

透明质酸钠溶液优选是含有 0.001-1 % ( w/v ) 透明质酸钠的水溶液，用于溶解透明质酸钠的水，其中的热源物质优选低于 0.01EU/ml。

为除去该透明质酸钠溶液中的杂菌或不溶物，也可用 0.2-0.5  $\mu$  m 的过滤器进行过滤处理。

另外，为除去透明质酸钠溶液中的热源物质，也可以使用在特定的 pH 范围带正电的过滤器进行过滤处理。

上述过滤器只要是在 pH3-10 的水溶液中带正电的过滤器即可。优选使用膜过滤器。

作为上述的过滤器，优选是由尼龙-66 等聚酰胺树脂作为一种成分组成的共聚物形成的膜孔径为 0.20-5.0  $\mu$  m 的过滤器。该过滤器的具体例子可以举出日本ボール(株)制的ポジダイン过滤器(商品名)、プロファイルIIプラス(商品名)等。

使用该过滤器进行过滤处理时，为提高过滤速度，可以添加盐或升高透明质酸钠溶液的液温。

所说的盐，其中的碱成分是由锂、钠、钾等碱金属离子，镁、钙等

碱土金属离子等，以及铵离子等构成的阳性成分，其中的酸成分是由氯、溴等卤素离子，硫酸、硝酸等无机酸，以及甲酸、乙酸等有机酸的酸根构成的阴性成分，优选钠盐。盐可以单独或组合使用。

具体的盐例如可以举出氯化钠、硫酸钠、醋酸钠等。

相对于透明质酸溶液添加 0.1-30 % ( w/v ) 的盐。

透明质酸溶液的液温可以升温至 80 ℃。

在进行了上述过滤器过滤处理的透明质酸钠溶液中或在未进行该处理的透明质酸钠溶液中加入盐和水溶性有机溶剂。

可以单独使用或组合使用上述记载的盐。

相对于透明质酸溶液，优选加入 1 - 30 ( w/v ) 的盐。

水溶性有机溶剂的添加量是要使透明质酸钠的最终浓度为 30 - 90 % ( v/v )，这样可以使透明质酸钠析出。

作为水溶性有机溶剂，只要是可溶于水的有机溶剂即可使用，具体可以举出甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇等醇类，丙酮等酮类，二甲氧基乙烷、四氢呋喃、二噁烷等醚类，乙腈等。这些水溶性有机溶剂可单独或混合使用。另外，使用的水溶性有机溶剂优选热源物质含量低的。

通过向透明质酸钠溶液中加入水溶性有机溶剂，从析出、沉降的透明质酸钠中高效率地除去热源物质，为使透明质酸钠充分地沉降，通常在添加水溶性有机溶剂后放置 2 小时以上，使透明质酸钠沉降。此时，沉降的透明质酸钠成为凝胶状的比容小的半透明状态。

从透明质酸钠沉降后的溶液中除去上清液，从而除去热源物质。

另外，除去上清液后残留的透明质酸钠，可利用以下方法进一步除去热源物质。

在除去上清液的凝胶状的上述透明质酸钠中添加 50 - 100 % ( v/v ) 的水溶性有机溶剂，洗涤。利用该操作使上述透明质酸钠从凝胶状成为粉末状。根据需要，在该粉末状的透明质酸钠中再加入 50 - 100 % ( v/v ) 的水溶性有机溶剂，洗涤后真空干燥，获得热源物质含量为 0.0015-0.003EU/mg 以下的透明质酸钠。

热源物质的测定如下进行，将透明质酸钠溶于热源物质含量低于 0.006EU/ml 的水中，使透明质酸钠的浓度为 2g/l，使用トキシカラ-系

统（生化学工业社制），按照附带的操作手册进行比色分析。

以下给出本发明的实施例。

#### 实施例 1

将热源物质含量 0.02EU/mg 的透明质酸钠 25g 溶于热源物质含量低于 0.01EU/ml 的 10 升水中，用 0.45  $\mu$  m 的微孔过滤器进行进行过滤处理，得到滤液。

在上述滤液中加入氯化钠使氯化钠的浓度达到 58.5g/l，之后加入乙醇使乙醇的浓度为 50 或 44 %（v/v）。

上述溶液放置 5 小时，使透明质酸钠析出、沉降，除去该溶液的上清液，得到透明质酸钠的沉降物。

用 80 % 的乙醇水溶液洗涤上述沉降物，之后再用 100 % 乙醇洗涤。

真空干燥上述洗涤物，得到 20g 纯化的透明质酸钠。

表 1 给出上述得到的透明质酸钠中的热源物质的含量。

表 1

析出时乙醇浓度(v/v%)	热源物质含量 ( EU/mg )
50	0.005
44	0.003 以下

#### 实施例 2

将热源物质含量 0.02EU/mg 的透明质酸钠 25g 溶于热源物质含量低于 0.01EU/ml 的 10 升水中，之后用 0.45  $\mu$  m 的微孔过滤器过滤，得到滤液。

在上述滤液中加入氯化钠使氯化钠的浓度为 58.5g/l，之后加入丙酮使丙酮浓度为 50、44 或 41 %（v/v）。

上述溶液放置约 5 小时，使透明质酸钠析出、沉降，除去该溶液的上清液，得到透明质酸钠的沉降物。

用 80 % 丙酮洗涤上述沉淀物，用 100 % 丙酮洗涤。

表 2 给出上述得到的透明质酸钠中的热源物质含量。



表 2

析出时丙酮浓度(v/v%)	热源物质含量(EU/mg)
50	0.010
44	0.003
41	0.003 以下

### 实施例 3

将兽痘链球菌 ( *Streptococcus zooepidemicus* ) NCTC 7023[J.Gen.Microbiol.,15,485-491(1956)]用脑、心脏浸剂肉汤琼脂培养基(日水制药社制)在 37℃ 下培养 16 小时,得到的菌体接种到 300ml 种培养基 ( pH7.0 ) 上,所说的种培养基由 1 % 葡萄糖、 1.5% 胨、 0.5 % 酵母提取物、 1 % 玉米浸渍液、 0.3 % 谷氨酸一钠、 0.2 % 磷酸氢二钾、 0.05 % 硫酸镁、 0.1 % 硫代硫酸钠、 2 % 碳酸钙组成, 37℃ 下振荡培养 16 小时。

将上述种培养液 150ml 接种到装有 3 升发酵培养基 ( pH7.2 ) 的容积为 5 升的发酵罐中,所说发酵培养基由 2.5 % 葡萄糖、 1.5 % 胨、 0.5 % 酵母提取物、 0.5 % 玉米浸渍液、 0.2 % 磷酸氢二钾、 0.005 % 硫酸镁、 0.1 % 硫代硫酸钠组成。接种后在 37℃、通气量 0.3vvm、pH7.0 条件下培养 26 小时,得到透明质酸培养液。

将上述透明质酸培养液 3 升用去离子水稀释至 20 升,加入 200g 碳,室温搅拌 1 小时后,用努采漏斗过滤,得到 20 升碳处理液。

使上述碳处理液以 5 升/小时的流速连续流过大网络型阴离子交换树脂 Diaion HPA - 75 (三菱化学社制) 2.5 升和凝胶型强酸性阳离子交换树脂 SK1B (三菱化学社制) 1.25 升,得到 20 升色谱处理液。

将上述处理液用氢氧化钠调节 pH 为 7.0, 加入 200g 碳,室温下搅拌 1 小时。

搅拌后用努采漏斗过滤,得到的滤液用 0.45  $\mu$  m 的微孔过滤器过滤,得到 20 升的滤液。

该滤液的热源物质含量相对于透明质酸钠为 0.04EU/mg。

在上述滤液中加入 1.2kg 氯化钠，加入 14 升丙酮，放置约 5 小时使透明质酸钠析出沉降，除去该溶液的上清液，得到透明质酸钠的沉降物。上述沉淀物用 80 % 丙酮洗涤后用 100 % 丙酮洗涤。真空干燥上述洗涤物，得到 11.5g 纯化透明质酸钠。表 3 给出上述获得的透明质酸钠中的热源物质含量。

表 3

析出时丙酮浓度(v/v%)	热源物质含量(EU/mg)
41	0.003 以下

#### 实施例 4

将来自鸡冠的热源物质含量为 0.02EU/mg 的透明质酸钠 25g 溶于热源物质含量低于 0.01EU/ml 的 10 升水中，之后用 0.45  $\mu$  m 微孔过滤器过滤，得到滤液。

在上述滤液中加入氯化钠使其浓度达到 58.5g/l，然后加入丙酮使丙酮浓度为 41 % (v/v)。

上述溶液放置约 5 小时，使透明质酸钠析出、沉降，除去该溶液的上清液，得到透明质酸钠的沉降物。该沉降物用 80 % 丙酮洗涤后再用 100 % 丙酮洗涤。

真空干燥上述洗涤物，获得 20g 纯化透明质酸钠。

表 4 给出上述得到的透明质酸钠中的热源物质含量。

表 4

析出时丙酮浓度(v/v%)	热源物质含量(EU/mg)
41	0.003 以下

#### 实施例 5

将热源物质含量 0.02EU/mg、分子量 230 万的透明质酸钠 25g 溶于 10 升热源物质含量 0.01EU/ml 以下的水中。

在上述溶液中加入氯化钠使其浓度达到 10g/l。

使用在 pH3-10 的范围带正电的微孔过滤器[绝对过滤精度 0.45  $\mu$  m，日本ボール(株)制的ポジダイン过滤器(商品名)]，过滤温度 25  $^{\circ}$ C，过滤处理上述透明质酸溶液，得到滤液。

在上述滤液中加入氯化钠，使氯化钠的浓度达到 58.5g/l 后，加入乙醇，使乙醇浓度为 44 % ( v/v )。

该溶液放置约 5 小时，使透明质酸钠析出、沉降，除去该溶液的上清液，得到透明质酸钠的沉降物。

用 80 % 乙醇的水溶液洗涤上述沉降物后，用 100 % 乙醇洗涤。真空干燥该洗涤物获得 20g 的纯化透明质酸钠。

表 5 给出获得的透明质酸钠中的热源物质含量。

表 5

热源物质含量 ( EU/mg )		
溶液	膜过滤器滤液	透明质酸钠
0.020	0.005	0.0015 以下

#### 实施例 6

将热源物质含量 0.02EU/mg、分子量 60 万的透明质酸钠 50g 溶于 10 升热源物质含量低于 0.01EU/ml 的水中。

在上述溶液中加入氯化钠，使氯化钠的浓度达到 10g/l。

使用在 pH3 - 10 的范围带正电的膜过滤器[绝对过滤精度 0.45  $\mu$  m，日本ボール（株）制的ポジサイン过滤器（商品名）]，过滤温度 25  $^{\circ}$ C，过滤处理上述透明质酸溶液，得到滤液。

在该滤液中加入氯化钠，使氯化钠浓度达到 58.5g/l，之后加入乙醇，使乙醇浓度达到 44 % ( v/v )。

该溶液放置约 5 小时使透明质酸钠析出、沉降，除去该溶液的上清液，得到透明质酸钠的沉降物。

用 80 % 乙醇洗涤上述沉降物后用 100 % 乙醇洗涤。

真空干燥上述洗涤物，得到 40g 纯化透明质酸钠。

表 6 给出上述获得的透明质酸钠中的热源物质含量。

表 6

热源物质含量 ( EU/mg )		
溶液	膜过滤器滤液	透明质酸钠
0.020	0.005	0.0015 以下

## 实施例 7

将兽瘟链球菌 ( *Streptococcus zooepidemicus* ) NCTC7023[J.Gen.Microbiol.,15,485-491(1956)]在脑、心脏浸剂琼脂培养基(日水制药社制)中于 37℃ 下培养 16 小时,所得菌体接种到 300ml 种培养基 ( pH7.0 ) 中, 37℃ 下振荡培养 16 小时,上述种培养基由 1 % 葡萄糖、 1.5 % 胨, 0.5 % 酵母提取物、 1 % 玉米浸渍液、 0.3 % 谷氨酸一钠、 0.2 % 磷酸氢二钾、 0.05 % 硫酸镁、 0.1 % 硫代硫酸钠、 2 % 碳酸钙组成。

将上述种培养液 150ml 接种到装有 3 升发酵培养基 ( Ph 7.2 ) 的容积为 5 升的发酵罐中,所说的发酵培养基由 2.5 % 葡萄糖、 1.5 % 胨、 0.5 % 酵母提取物、 0.5 % 玉米浸渍液、 0.2 % 磷酸氢二钾、 0.005 % 硫酸镁、 0.1 % 硫代硫酸钠组成。接种后在 37℃、通气量 0.3vvm、 pH7.0 的条件下培养 26 小时,得到透明质酸培养液。

将 3 升上述的透明质酸培养液用去离子水稀释成 20 升,加入 200g 碳,室温下搅拌 1 小时后,用努采漏斗过滤,得到 20 升碳处理液。

使上述碳处理液以 5 升/小时的流速连续流过大网络型阴离子交换树脂 Diaion HPA-75 (三菱化学社制) 2.5 升和凝胶型强酸性阳离子交换树脂 SK1B (三菱化学社制) 1.25 升,得到 20 升色谱处理液。

将上述处理液用氢氧化钠调节 pH 为 7.0,之后加入 200g 碳,室温下搅拌 1 小时,用努采漏斗过滤,得到滤液。

在上述滤液中加入氯化钠,使氯化钠浓度达到 10g/l。

使用在 pH3 - 10 的范围带正电的膜过滤器[绝对过滤精度 0.45  $\mu$  m, 日本ポ-ル(株)制的ポジダイン过滤器(商品名)],过滤温度 25℃,过滤处理该透明质酸溶液,得到 18 升滤液。

上述滤液中的热源物质含量为 0.01EU/mg (相对于透明质酸钠)。

在上述滤液中加入 1.1kg 的氯化钠,加入 14 升的乙醇。

放置约 5 小时,使透明质酸钠析出、沉降,除去该溶液的上清液,得到透明质酸钠的沉降物。

将沉降物用 80 % 乙醇洗涤后再用 100 % 乙醇洗涤。

真空干燥上述洗涤物，得到 10.0g 纯化透明质酸钠。用极限粘度法分析该透明质酸钠的分子量，为 20 万。

表 7 给出上述得到的透明质酸钠中的热源物质含量。

表 7

热源物质含量 ( EU/mg )
0.0015 以下

### 实施例 8

将来自鸡冠的热源物质含量为 0.02EU/mg、分子量 100 万的透明质酸钠 50g 溶于 10 升热源物质含量为 0.01EU/ml 以下的水中。

在该溶液中加入氯化钠，使氯化钠浓度达到 10g/l。

使用在 pH3 - 10 的范围带正电的膜过滤器[绝对过滤精度 0.45  $\mu$  m，日本ボール（株）制的ボジタイン过滤器（商品名）]，过滤温度 25  $^{\circ}$ C，过滤处理该透明质酸溶液，得到滤液。

在上述滤液中加入氯化钠，使氯化钠的浓度达到 58.5g/l 后，加入丙酮，使丙酮浓度为 41 % ( v/v )。

上述溶液放置约 5 小时，使透明质酸钠析出、沉降，除去该溶液的上清液，得到透明质酸钠的沉降物。

将上述沉淀物用 80 % 丙酮洗涤后再用 100 % 丙酮洗涤。

真空干燥上述洗涤物，得到 40g 纯化透明质酸钠。

表 8 给出上述得到的透明质酸钠中的热源物质含量。

表 8

热源物质含量 ( EU/mg )		
溶液	膜过滤器滤液	透明质酸钠
0.020	0.005	0.0015 以下

### 实施例 9

将热源物质含量 0.1EU/mg、分子量 230 万的透明质酸钠 10g 溶于 10 升热源物质含量低于 0.01EU/ml 的水中。

在上述溶液中加入氯化钠，使氯化钠的浓度达到 10g/l。

使用在 pH3 - 10 的范围带正电的微孔过滤器[绝对过滤精度 0.2  $\mu$  m, 日本ポ-ル(株)制的ポジダイソ过滤器(商品名)], 过滤温度 25  $^{\circ}$ C, 过滤处理该透明质酸溶液, 得到滤液。

在上述滤液中加入氯化钠, 使氯化钠的浓度达到 58.5g/l, 之后加入乙醇, 使乙醇浓度为 44 % ( v/v )。

上述溶液放置约 5 小时, 使透明质酸钠析出、沉降, 除去该溶液的上清液, 得到透明质酸钠的沉降物。

用 80 % 乙醇洗涤上述沉降物后用 100 % 乙醇洗涤。

真空干燥上述洗涤物, 得到 2g 纯化透明质酸钠。

表 9 给出上述得到的透明质酸钠中的热源物质含量。

表 9

热源物质含量 ( EU/mg )	
溶液	透明质酸钠
0.1	0.0015 以下

利用本发明可以提供容易地获得热源物质含量低、高纯度的透明质酸钠的纯化方法, 以及由该方法获得的透明质酸钠。